

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

07.12.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 9 月 9 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 3 1 7 1 0 4
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 3 - 3 1 7 1 0 4]

出 願 人 富 士 写 真 フ ィ ル ム 株 式 会 社
Applicant(s):

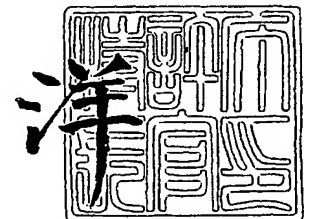
Best Available Copy

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

2 0 0 5 年 1 月 2 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願
【整理番号】 A31379A
【提出日】 平成15年 9月 9日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C07K 1/14
C12M 1/32
C12N 9/10
C12Q 1/02

【発明者】
【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水 3 - 1 1 - 4 6 富士写真フイルム株式会社内
【氏名】 森 寿弘

【発明者】
【住所又は居所】 埼玉県朝霞市泉水 3 - 1 1 - 4 6 富士写真フイルム株式会社内
【氏名】 牧野 快彦

【特許出願人】
【識別番号】 000005201
【氏名又は名称】 富士写真フイルム株式会社

【代理人】
【識別番号】 110000109
【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス
【代表者】 今村 正純

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 170347
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1
【包括委任状番号】 0205141

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

固相に核酸を吸着させる溶液及び固相から核酸を脱着させる溶液をそれぞれ用いて固相に核酸を吸着及び脱着させる工程を含む、核酸の分離精製方法において、固相に核酸を吸着させる溶液が消泡剤を含むことを特徴とする核酸の分離精製方法。

【請求項 2】

固相が表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相である、請求項 1 に記載の核酸の分離精製方法。

【請求項 3】

固相がシリカ又はその誘導体、珪藻土、又はアルミナから成る固相である、請求項 1 に記載の核酸の分離精製方法。

【請求項 4】

表面に水酸基を有する有機高分子がアセチルセルロースの表面鹸化物である、請求項 2 に記載の核酸の分離精製方法。

【請求項 5】

表面に水酸基を有する有機高分子がトリアセチルセルロースの表面鹸化物である、請求項 4 に記載の核酸の分離精製方法。

【請求項 6】

アセチルセルロースが多孔膜である、請求項 5 に記載の核酸の分離精製方法。

【請求項 7】

消泡剤が、シリコン系消泡剤とアルコール系消泡剤の 2 つの成分を含む、請求項 1 から 6 の何れかに記載の核酸の分離精製方法。

【請求項 8】

アルコール系消泡剤が、アセチレングリコール系界面活性剤である、請求項 7 に記載の核酸の分離精製方法。

【請求項 9】

少なくとも 2 個の開口を有する容器内に固相を収容した核酸分離精製ユニットを用いて核酸の吸着及び脱着を行う、請求項 1 から 8 の何れかに記載の核酸の分離精製方法。

【請求項 10】

(a) 固相、(b) 前記固相を収容する少なくとも 2 個の開口を有する容器、及び(c) 前記容器の一の開口に結合された圧力差発生装置を含む核酸分離精製ユニットを用いて核酸の吸着及び脱着を行う、請求項 1 から 9 の何れかに記載の核酸の分離精製方法。

【請求項 11】

圧力差発生装置が加圧の装置である、請求項 10 に記載の核酸の分離精製方法。

【請求項 12】

圧力差発生装置が減圧の装置である、請求項 10 に記載の核酸の分離精製方法。

【請求項 13】

請求項 1 から 12 の何れかに記載の核酸の分離精製方法において用いるための固相に核酸を吸着させる溶液であって、消泡剤を含有することを特徴とする上記溶液。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸の分離精製方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、核酸を分離精製する方法、及び上記方法で用いるための固相に核酸を吸着させる溶液に関する。

【背景技術】

【0002】

核酸は、様々な分野で種々の形態で使用されている。例えば、組換え核酸技術の領域においては、核酸をプローブ、ゲノム核酸、およびプラスミド核酸の形状で用いることを要求する。

【0003】

診断分野においても、核酸は種々の方法で用いられている。例えば、核酸プローブは、ヒトの病原体の検出および診断に日常的に用いられている。同様に核酸は遺伝障害の検出に用いられている。核酸はまた食品汚染物質の検出にも用いられている。さらに、核酸は遺伝地図の作製からクローニングおよび組換え発現におよぶ種々の理由により、興味ある核酸の位置確認、同定および単離において日常的に用いられている。

【0004】

多くの場合、核酸は極めて少量でしか入手できず、そして単離および精製操作が煩雑で時間を要する。このしばしば時間を消費する煩雑な操作は核酸の損失に結びつきやすい。血清、尿およびバクテリアのカルチャーから得られた試料の核酸の精製においては、コンタミネーションおよび疑陽性の結果が生じるという危険性も加わる。

【0005】

また、簡便かつ効率よく核酸を分離精製する方法の一つとして、固相に核酸を吸着させる溶液及び固相から核酸を脱着させる溶液をそれぞれ用いて、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に核酸を吸着及び脱着させることによって、核酸を分離精製する方法が報告されている（特開 2003-128691 号公報）。

【0006】

【特許文献 1】 特開 2003-128691 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

上記したような核酸を分離精製する方法を実施する際、特に、全血検体を処理した液は、粘度が高く、さらに細胞を破壊するために添加している界面活性剤の副次的効果によりこの処理液を固相に吸着させる工程においては起泡が激しいという問題が見出された。この泡が飛散するとコンタミの原因となるため、泡はなるべく少ないことが望まれる。即ち、本発明の目的は、検体中の核酸を固相表面に吸着させた後、洗浄等を経て脱着させて核酸を分離精製する方法において、工程中に発生した泡をなくす方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、固相に核酸を吸着させる溶液中に消泡剤を添加することによって泡の発生を抑制できることを見出した。本発明においては特に、シリコン系消泡剤とアルコール系消泡剤の 2 つの成分を添加することにより泡が劇的に少なくなることが判明した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

【0009】

即ち、本発明によれば、固相に核酸を吸着させる溶液及び固相から核酸を脱着させる溶液をそれぞれ用いて固相に核酸を吸着及び脱着させる工程を含む、核酸の分離精製方法において、固相に核酸を吸着させる溶液が消泡剤を含むことを特徴とする核酸の分離精製方

法が提供される。

【0010】

好ましくは、固相は、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相である。
あるいは、固相は、シリカ又はその誘導体、珪藻土、又はアルミナから成る固相である。

好ましくは、表面に水酸基を有する有機高分子はアセチルセルロースの表面鹸化物である。

さらに好ましくは、表面に水酸基を有する有機高分子はトリアセチルセルロースの表面鹸化物である。

好ましくは、アセチルセルロースは多孔膜である。

【0011】

好ましくは、消泡剤は、シリコン系消泡剤とアルコール系消泡剤の2つの成分を含む。

さらに好ましくは、アルコール系消泡剤は、アセチレングリコール系界面活性剤である。

【0012】

好ましくは、少なくとも2個の開口を有する容器内に固相を収容した核酸分離精製ユニットを用いて核酸の吸着及び脱着を行う。

さらに好ましくは、(a) 固相、(b) 前記固相を収容する、少なくとも2個の開口を有する容器、及び(c) 前記容器の一の開口に結合された圧力差発生装置を含む核酸分離精製ユニットを用いて核酸の吸着及び脱着を行う。圧力差発生装置は加圧の装置でもよいし、減圧の装置でもよい。

【0013】

本発明の別の側面によれば、上記した何れかの核酸の分離精製方法において用いるための固相に核酸を吸着させる溶液であって、消泡剤を含有することを特徴とする上記溶液が提供される。

【発明の効果】

【0014】

本発明の方法により、泡の発生を抑制することができ、これにより核酸を含む試料溶液から純度の高い核酸を効率良く分離することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

以下、本発明の実施の形態について説明する。

本発明の核酸の分離精製方法は、核酸含有試料から核酸を分離精製する方法に関するものであり、固相（例えば、表面に水酸基を有する有機高分子からなる固相など）に、試料中の核酸を吸着及び脱着させる工程を含み、固相に核酸を吸着させる溶液が消泡剤を含むことを特徴とする。

【0016】

本発明で用いる消泡剤の具体例としては、シリコン系消泡剤（例えば、シリコンオイル、ジメチルポリシロキサン、シリコンエマルジョン、変性ポリシロキサン、シリコンコンパウンドなど）、アルコール系消泡剤（例えば、アセチレングリコール、ヘプタノール、エチルエキサノール、高級アルコール、ポリオキシアルキレングリコールなど）、エーテル系消泡剤（例えば、ヘプチルセロソルブ、ノニルセロソルブ-3-ヘプチルコルビトールなど）、油脂系消泡剤（例えば、動植物油など）、脂肪酸系消泡剤（例えば、ステアリン酸、オレイン酸、パルミチン酸など）、金属セッケン系消泡剤（例えば、ステアリン酸アルミ、ステアリン酸カルシウムなど）、脂肪酸エステル系消泡剤（例えば、天然ワックス、トリブチルホスフェートなど）、リン酸エステル系消泡剤（例えば、オクチルリン酸ナトリウムなど）、アミン系消泡剤（例えば、ジアミルアミンなど）、アミド系消泡剤（例えば、ステアリン酸アミドなど）、その他の消泡剤（例えば、硫酸第二鉄、ボーキサイトなど）などが挙げられる。特に好ましくは、消泡剤として、シリコン系消泡剤とアルコール系消泡剤の2つの成分を組み合わせて使用することができる。また、アルコール系消泡剤としては、アセチレングリコール系界面活性剤を使用することも好ましい。

【0017】

本発明において「核酸」は一本鎖、二本鎖のいずれでもよく、また、分子量の制限も無い。

【0018】

試料とは、核酸を含む任意の試料を意味する。試料中の核酸の種類は1種類でも2種類以上の複数でもよい。個々の核酸の長さも特に限定されず、例えば、数bp～数Mbpの任意の長さの核酸を使用することができる。取り扱い上の観点からは、核酸の長さは一般的には、数bp～数百kbp程度である。

【0019】

固相の種類は特に限定されず、例えば、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相や、あるいは二酸化珪素、シリカポリマー又は珪酸マグネシウムから成る固相、あるいはシリカ又はその誘導体、珪藻土、又はアルミナから成る固相などを使用することができる。好ましくは、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相を使用することができる。

【0020】

表面に水酸基を有する有機高分子としては、アセチルセルロースの鹸化物が好ましい。アセチルセルロースとしては、モノアセチルセルロース、ジアセチルセルロース、トリアセチルセルロースの何れでもよいが、特にトリアセチルセルロースが好ましい。本発明では、表面鹸化したアセチルセルロースを固相として使用することが好ましい。ここで表面鹸化とは、鹸化处理液（例えば、NaOH）が接触する表面だけが鹸化されることを言う。本発明では、固相の構造体はアセチルセルロースのままで、固相の表面だけが鹸化されていることが好ましい。これにより、鹸化处理の程度（鹸化度）で固相表面の水酸基の量（密度）をコントロールすることができる。

【0021】

表面に水酸基を有する有機高分子の表面積を大きくするためには、表面に水酸基を有する有機高分子を膜化することが好ましい。また、アセチルセルロースは多孔膜でも非孔性膜でもよいが、膜を多孔性とすることが更に好ましい。固相が多孔性膜の場合、膜の構造体はアセチルセルロースのままで、構造体の表面だけを鹸化することが好ましい。これにより、鹸化处理の程度（鹸化度）×孔径により空間的な水酸基の量（密度）をコントロールすることができる。また、膜の構造体はアセチルセルロースから構成されているため、堅固な固相を得ることができる。

【0022】

例えば、トリアセチルセルロースの膜は、商品名TACベースとして富士写真フイルムから市販されており、トリアセチルセルロースの多孔膜としては、マイクロフィルターFM500（富士写真フイルム（株）製）がある。

また、例えばポリエチレン製のビーズの表面にトリアセチルセルロースの膜を形成し、これを鹸化して表面に水酸基を持たせることも好ましい。この場合、トリアセチルセルロースはビーズにコーティングされることになる。ビーズの素材は、核酸を汚染等しなければよく、ポリエチレンには限定されない。

【0023】

核酸の分離効率を上げるためには、水酸基の数が多い方が好ましい。例えば、トリアセチルセルロースなどのアセチルセルロースの場合には、鹸化率が約5%以上であることが好ましく、10%以上であることが更に好ましい。

アセチルセルロースを鹸化するには、水酸化ナトリウム水溶液中に、鹸化したい対象を浸漬する。鹸化率を変えるには、水酸化ナトリウムの濃度を変えればよい。鹸化率は、NMRにより、残存アセチル基を定量して定められる。

【0024】

本発明の核酸の分離精製方法では、好ましくは、少なくとも2個の開口を有する容器内に固相（例えば、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相）を収容した核酸分離精製ユニットを用いて核酸の吸着及び脱着を行うことができる。

【0025】

さらに好ましくは、(a) 固相（例えば、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相）、(b) 前記固相を収容する、少なくとも2個の開口を有する容器、及び(c) 前記容器の一の開口に結合された圧力差発生装置を含む核酸分離精製ユニットを用いて核酸の吸着及び脱着を行うことができる。

【0026】

この場合の本発明の核酸の分離精製方法の第一の実施態様は、以下の工程を含むことができる。

- (a) 核酸分離精製ユニットの一の開口を核酸を含む試料溶液中に挿入する工程、
- (b) 核酸分離精製ユニットの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を減圧状態にして核酸を含む試料溶液を吸引し、固相に接触させる工程、
- (c) 核酸分離精製ユニットの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、吸引された核酸を含む試料溶液を容器外に排出する工程、
- (d) 核酸分離精製ユニットの一の開口を核酸洗浄バッファ溶液中に挿入する工程、
- (e) 核酸分離精製ユニットの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を減圧状態にして核酸洗浄バッファ溶液を吸引し、固相に接触させる工程、
- (f) 核酸分離精製ユニットの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、吸引された核酸洗浄バッファ溶液を容器外に排出する工程、
- (g) 核酸分離精製ユニットの一の開口を、固相に吸着された核酸を脱着せしめうる液中に挿入する工程、
- (h) 核酸分離精製ユニットの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を減圧状態にして、固相に吸着された核酸を脱着せしめうる液を吸引し、固相に接触させる工程、及び
- (i) 核酸分離精製ユニットの他の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、固相に吸着された核酸を脱着せしめうる液を容器外に排出する工程。

【0027】

本発明の核酸の分離精製方法の第二の実施態様は、以下の工程を含むことができる。

- (a) 検体を用いて核酸を含む試料溶液を調製し、核酸分離精製ユニットの一の開口に上記の核酸を含む試料溶液を注入する工程、
- (b) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、注入した核酸を含む試料溶液を、他の開口より排出することによって、固相に接触させる工程、
- (c) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に核酸洗浄バッファを注入する工程、
- (d) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、注入した核酸洗浄バッファを上記他の開口より排出することによって、固相に接触させる工程、
- (e) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に固相に吸着された核酸を脱着せしめうる液を注入する工程、
- (f) 核酸分離精製ユニットの上記一の開口に結合された圧力差発生装置を用いて容器内を加圧状態にし、注入した核酸を脱着せしめうる液を上記他の開口より排出させることによって、固相に吸着された核酸を脱着させ、容器外に排出する工程。

【0028】

本発明による核酸の分離精製方法についてさらに具体的に説明する。本発明では、好ましくは、核酸を含む試料溶液を固相（例えば、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相）に接触させることにより試料溶液中の核酸を固相に吸着させ、次いで、固相に吸着させた核酸を、以下に説明する好適な溶液を用いて固相から脱着させる。さらに好ましくは、核酸を含む試料溶液は、細胞又はウイルスを含む検体を細胞膜及び核膜を溶解する溶液で処理することにより核酸を液中に分散させた溶液に水溶性有機溶媒を添加し、さらに消泡剤を添加した溶液である。

【0029】

本発明において使用できる核酸を含む試料溶液に制限はないが、例えば診断分野におい

ては、検体として採取された全血、血漿、血清、尿、便、精液、唾液等の体液、あるいは植物（又はその一部）、動物（またはその一部）など、あるいはそれらの溶解物およびホモジネートなどの生物材料から調製された溶液が対象となる。

【0030】

最初にこれらの検体を、細胞膜を溶解して核酸を可溶化する試薬を含む水溶液で処理する。これにより細胞膜および核膜が溶解されて、核酸が水溶液内に分散する。

【0031】

細胞膜の溶解および核酸の可溶化のためには、例えば、対象となる試料が全血の場合、1)赤血球の除去、2)各種タンパク質の除去、及び3)白血球の溶解及び核膜の溶解が必要となる。1)赤血球の除去および2)各種タンパク質の除去は、固相への非特異吸着および多孔膜の目詰まりを防ぐために、3)白血球の溶解及び核膜の溶解は、抽出の対象である核酸を可溶化させるためにそれぞれ必要となる。特に、3)白血球の溶解及び核膜の溶解は重要な工程であり、本発明の方法では、この工程で核酸を可溶化することが必要である。例えば、塩酸グアニジン、T r i t o n-X100、プロテアーゼK（S I G M A製）を添加した状態で60℃で10分インキュベートすることによって上記の1)、2)及び3)を同時に達成することができる。

【0032】

本発明で用いる核酸可溶化試薬としては、グアニジン塩、界面活性剤、タンパク質分解酵素、及び消泡剤を含む溶液が挙げられる。

【0033】

グアニジン塩としては、塩酸グアニジンが好ましいが、他のグアニジン塩（イソチオシアン酸グアニジン、チオシアン酸グアニジン）を使用することもできる。グアニジン塩の溶液中の濃度は、0.5 M以上6 M以下 好ましくは 1 M以上5 M以下である。

【0034】

界面活性剤としてはT r i t o n-X100を使用することができるが、この他にも、SDS、コール酸ナトリウム又はサルコシナトリウム等の陰イオン性界面活性剤、T w e e n 20又はメガファック等のノニオン性界面活性剤、その他各種両性界面活性剤を使用することもできる。本発明では、ポリオキシエチレンオキチルフェニルエーテル（T r i t o n-X100）等のノニオン性界面活性剤を使用することが好ましい。界面活性剤の溶液中の濃度は、通常0.05重量%～10重量% 特に好ましくは0.1重量%～5重量%である。

【0035】

タンパク質分解酵素としては、プロテアーゼKを使用することはできるが、他のプロテアーゼでも同様の効果を得ることができる。プロテアーゼは酵素であるため加温するのが好ましく、37℃～70℃で使用する事が好ましく、特に50℃～65℃で使用する事が好ましい。

【0036】

消泡剤としては、本明細書中上記したものをを使用することができる。

【0037】

このように核酸が分散した水溶液中に、水溶性有機溶媒を添加して、固相と接触させる。この操作により、試料溶液中の核酸が固相（例えば、表面に水酸基を有する有機高分子）に吸着される。本明細書中上記した操作で可溶化された核酸を、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相に吸着させるためには、可溶化した核酸混合液に水溶性有機溶媒を混合することと、得られた核酸混合液中に塩が存在することが必要である。

【0038】

即ち、核酸の周りに存在する水分子の水和構造を破壊することにより、核酸は不安定な状態で可溶化することになる。この状態の核酸を、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相と接触させると、核酸表面上の極性基と固相表面の極性基間で相互作用し、核酸は固相表面上に吸着するものと考えられる。本発明の方法では、可溶化した核酸混合液に水溶性有機溶媒を混合することと、得られた核酸混合液中に塩が存在することによって、

核酸を不安定な状態にさせることができる。

【0039】

ここで用いる水溶性有機溶媒としては、エタノール、イソプロパノール又はプロパノールなどが挙げられ、中でもエタノールが好ましい。水溶性有機溶媒の濃度は、好ましくは5重量%～90重量%であり、さらに好ましくは20重量%～60重量%である。エタノールの添加濃度は、凝集物を生じない程度でできるだけ高くすることが特に好ましい。

【0040】

得られた核酸混合液中に存在する塩としては、各種カオトロピック物質（グアニジウム塩、ヨウ化ナトリウム、過塩素酸ナトリウム）や塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化アンモニウム、臭化ナトリウム、臭化カリウム、臭化カルシウム、臭化アンモニウム等が好ましい。特にグアニジウム塩は、細胞膜の溶解および核酸の可溶化の効果を併有するので特に好ましい。

【0041】

次いで、この核酸が吸着した固相を核酸洗浄バッファ溶液に接触させる。この溶液は核酸と一緒に固相に吸着した試料溶液中の不純物を洗い流す機能を有する。従って、固相から核酸は脱着させないが不純物は脱着させる組成を有する必要がある。核酸洗浄バッファ溶液は主剤と緩衝剤、及び必要に応じて界面活性剤を含む水溶液からなる。主剤としてはメタノール、エタノール、イソプロパノール、*n*-イソプロパノール、ブタノール、アセトン等の約10～100重量%（好ましくは約20～100重量%、さらに好ましくは約40～80重量%）の水溶液が、緩衝剤及び界面活性剤としては、既述の緩衝剤及び界面活性剤が挙げられる。これらの内では、エタノール、Tris及びTriton-X100を含む溶液が好ましい。Tris及びTriton-X100の好ましい濃度は、それぞれ10～100mM、及び0.1～10重量%である。

【0042】

次に、固相に吸着した核酸を脱着せしめうる溶液に、上記洗浄後の固相を接触させる。この溶液には目的とする核酸が含まれているので、これを回収し、後に続く操作、例えばPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）による核酸の増幅に提供する。核酸を脱着せしめうる溶液としては、塩濃度が低いことが好ましく、特に好ましくは0.5M以下の塩濃度の溶液を使用する。この溶液としては、精製蒸留水、TEバッファ等が使用できる。

【0043】

本発明で使用する核酸分離精製ユニットは、少なくとも2個の開口を有する容器内に表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相を収容した核酸分離精製ユニットである。

容器の材料に特別な限定はなく、表面に水酸基を有する有機高分子が収容でき、かつ少なくとも2個の開口を設けることができればよいが、製造の容易性からプラスチックが好ましい。例えば、ポリスチレン、ポリメタアクリル酸エステル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ナイロン、ポリカーボネート等の透明あるいは不透明の樹脂を用いるのが好ましい。

【0044】

容器は、固相の収容部を持ち、収容部に固相を収容でき、固相が試料液等の吸引及び排出時に収容部の外へは出ることがなく、開口に圧力差発生装置、例えば注射器を接合できればよい。このためには、容器が当初は二つの部分に分かれており、固相を収容した後で一体化できることが好ましい。また、固相が収容部から外へでることをさける為には、固相の上下にDNAを汚染しない材料で作成されたメッシュを置くことができる。

【0045】

上記容器に収容される固相の形状にも特別な限定は無く、円形、正方形、長方形、楕円、膜の場合には筒状、巻物状、あるいは表面に水酸基を有する有機高分子をコーティングしたビーズ等、任意の形状で良いが、製造適性の点からは、円、正方形、円筒状、巻物状等の対称性の高い形状及びビーズが好ましい。

【0046】

上記容器の一の開口を核酸を含む試料溶液中に挿入し、他の一の開口から吸引して表面

に水酸基を有する有機高分子に試料溶液を接触させ、これを排出し、次いで核酸洗浄バッファ溶液を吸引・排出し、次いで、表面に水酸基を有する有機高分子に吸着した核酸を脱着せしめうる溶液を吸引・排出して、この排出液を回収することにより、目的とする核酸を得ることができる。

【0047】

本発明で使用する核酸分離精製ユニットは、(a) 固相（例えば、表面に水酸基を有する有機高分子から成る固相）、(b) 前記固相を収容する、少なくとも2個の開口を有する容器、及び(c) 前記容器の一の開口に結合された圧力差発生装置、を含むものであることが好ましい。以下、この核酸分離精製ユニットについて説明する。

【0048】

容器は、通常、固相を収容する本体と、蓋体に分けた態様で作製され、いずれにも少なくとも1個の開口が設けられている。一方は核酸を含有する試料溶液、核酸洗浄バッファ溶液及び固相に吸着された核酸を脱着せしめうる液（以下、「試料溶液等」と記す。）の入口及び出口として使用され、他方は容器内を減圧又は加圧状態にせしめうる圧力差発生装置に接続される。本体の形状に特に限定はないが、製造が容易で、試料溶液等が固相の全面に拡散し易くするには、断面を円形にすることが好ましい。断面を四角形にすることも、固相の裁断屑を発生させないために好ましい。

【0049】

上記蓋は、圧力差発生装置によって容器内部を減圧及び加圧状態にできるように本体に接合されている必要があるが、この状態が達成できれば、接合方法は任意に選択できる。例えば、接着剤の使用、ねじ込み、はめ込み、ネジ止め、超音波加熱による融着等が挙げられる。

【0050】

容器の内容積は処理すべき試料溶液の量のみによって決められるが、通常、収容される固相の体積で表す。即ち、厚さが約1mm以下（例えば、50～500 μ m程度）で、直径が約2mm～20mmの固相を1枚～6枚程度収容する大きさとすることが好ましい。

【0051】

固相の端面は、試料溶液等が通過しない程度に、容器の内壁面に密着させることが好ましい。

【0052】

試料溶液等の入り口に使用される開口に対向する固相の下は、容器の内壁面に密着させずに空間を設け、試料溶液等が固相の全面にできるだけ均等に拡散する構造にする。

【0053】

他の一の開口、即ち圧力差発生装置に結合される開口に対向する固相の上には、ほぼ中央に穴を穿った部材を設けることが好ましい。この部材は、固相を押さえると共に、試料溶液等を効率よく排出する効果を有するものであり、液が中央の穴に集まる様に、漏斗状あるいはお椀状等の斜面を有する形状にすることが好ましい。この穴の大きさ、斜面の角度、部材の厚さは、処理する試料溶液等の量や固相を収容する容器の大きさ等を考慮して、当業者が適宜定めることができる。この部材と当該開口の間には、オーバーフローした試料溶液等を溜めて、圧力差発生装置内に吸引されることを防ぐための空間を設けることが好ましい。この空間の大きさも当業者が適宜選択することができる。なお、核酸を効率良く集めるためには、固相の全体が浸る以上の量の核酸を含む試料溶液を吸引することが好ましい。

【0054】

また、吸引している開口の真下の部分にのみ試料溶液等が集中することを防いで、試料溶液等が固相内を比較的均一に通過できるようにするため、固相とこの部材の間にも空間を設けることが好ましい。このためには、当該部材から固相に向けて複数の突起物を設けることが好ましい。突起物の大きさや数は当業者が適宜選択することができるが、空間を保持しながら固相の開口面積をできる限り大きく保つことが好ましい。

【0055】

なお、容器に3以上の開口を設けた場合には、減圧及び加圧操作に伴う液の吸引及び排出を可能にすべく、余分の開口を一時的に封鎖する必要があることはいうまでもない。

【0056】

圧力差発生装置は、まず固相を収容した容器内を減圧にして核酸を含む試料溶液を吸引する。圧力差発生装置としては、注射器、ピペット、あるいはペリスタポンプのような吸引及び加圧が可能なポンプ等が挙げられる。これらの内、手動操作には注射器が、自動操作にはポンプが適している。また、ピペットは片手操作が容易にできるという利点を有する。好ましくは、圧力差発生装置は、前記容器の一の開口に着脱可能に結合されている。

【0057】

次に、上記した核酸分離精製ユニットを使用した、核酸の精製方法について説明する。まず、核酸を含む試料溶液中に、上記の核酸分離精製ユニットの一の開口を挿入する。次いで他の一の開口に接続された圧力差発生装置を用いて精製ユニットの内部を減圧にして試料溶液を容器内に吸入する。この操作により、試料溶液が固相と接触して試料溶液中にある核酸が固相に吸着する。この際に、固相のほぼ全体と接触する量の試料溶液を吸引することが好ましいが、圧力差発生装置内に吸引すると装置を汚染するので、適量に調整する。

【0058】

適量の試料溶液を吸引後、圧力差発生装置を用いてユニットの容器内を加圧して、吸引した液を排出する。この操作までに間隔を開ける必要はなく、吸引後直ちに排出してもよい。

【0059】

次に、上記と同様の減圧-加圧操作で核酸洗浄バッファ溶液を容器内に吸引し、これから排出して容器内部を洗浄する。この溶液は容器内に残留する試料溶液を洗い流すと共に、核酸と一緒に固相に吸着した試料溶液中の不純物も洗い流す機能を有する。従って、固相から核酸は脱着させないが不純物は脱着させる組成を有する必要がある。核酸洗浄バッファ溶液は主剤と緩衝剤、及び必要に応じて界面活性剤を含む水溶液からなり、主剤としてはメチルアルコール、エチルアルコール、ブチルアルコール、アセトン等の約10～90%（好ましくは約50～90%）の水溶液が、緩衝剤及び界面活性剤としては、既述の緩衝剤及び界面活性剤が挙げられる。これらの内では、エチルアルコール、T r i s 及び T r i t o n-X100を含む溶液が好ましい。T r i s 及び T r i t o n-X100の好ましい濃度は、それぞれ10～100mM、及び0.1～10%である。

【0060】

次に、固相に吸着した核酸を脱着せしめうる溶液を、上記と同様の減圧-加圧操作によって容器内部に導入し、容器から排出する。この排出液には目的とする核酸が含まれているので、これを回収し、後に続く操作、例えばPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）による核酸の増幅に提供することができる。

以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例】

【0061】

(1) 材料及び試薬

図1～図6に構造を示す核酸精製用カートリッジを使用し、第2開口部側より試料、洗浄液、蒸留水を順次注入し、そのたびにピストン部材（プランジャ）を挿入し、押した。また、核酸吸着固相としては、富士ミクロフィルターFR250（富士写真フイルム製）を使用した。核酸精製用吸着バッファ溶液（比較例 および本発明）及び洗浄バッファ溶液は以下の通り調製した。

【0062】

吸着バッファ（比較例）

塩酸グアニジン（ライフテクノロジー製）	382 g
T r i s（ライフテクノロジー製）	12.1 g

Triton-X100 (ICN製) 10 g
蒸留水 1000 ml

【0063】

吸着バッファー (本発明)

塩酸グアニジン (ライフテクノロジー製) 382 g
Tris (ライフテクノロジー製) 12.1 g
Triton-X100 (ICN製) 10 g
アセチレングリコール (エアプロダクツ製) 10 g
シリコンオイル (GE東芝シリコン製) 2 g
蒸留水 1000 ml

【0064】

洗浄バッファー

10 mM Tris-HCl 65% エタノール

【0065】

(2) 核酸精製操作

人全血試料200 μ lに、吸着バッファー200 μ l (比較例および本発明の2種類)とプロテアーゼK200 μ lを添加して、60℃で10分間インキュベートした。インキュベート後、エタノール200 μ lを加え、攪拌した。攪拌後、図1～図6に構造を示す核酸精製用カートリッジにこの液を注入した。注入後、ピストンにて液を押し出した。

【0066】

続いて、洗浄バッファー500 μ lを注入し、ピストンにて液を押し出すことにより、カートリッジおよび吸着固相上の不純物を洗浄した。最後に、蒸留水200 μ lを注入し、ピストンにて液を押し出して、この液をDNA溶液として回収した。

【0067】

(3) 核酸の回収量の定量

(2)の操作により精製されたDNAの収量および泡沫高さ(試料溶液の排出際、開口部から発生する泡沫の長さを測定した数値)を以下の表1に示す。表1の結果から、本発明により泡の発生量を抑制できることが分かる。

【0068】

表1:

試料No.	DNA (μ g)	泡沫高さ
1 (本発明)	4.2	7 mm
2 (本発明)	3.6	5 mm
3 (本発明)	5.7	3 mm
4 (本発明)	6.3	5 mm
5 (本発明)	5.0	11 mm
1 (比較例)	4.4	32 mm
2 (比較例)	3.9	30 mm
3 (比較例)	4.2	24 mm
4 (比較例)	5.8	45 mm
5 (比較例)	6.3	60 mm

【図面の簡単な説明】

【0069】

【図1】本発明の核酸分離精製装置を示す側断面図並びに逆止弁及び圧力センサー付きのピストン部材の一部拡大図である。

【図2】本発明の核酸分離精製装置の分解斜視図である。

【図3】シリンジと固相保持部材の接合方法の他の実施の形態を示す側断面図である。

【図4】固相保持部材の拡大断面図である。

【図5】シリンジの先端部の断面図である。

【図6】シリンジの先端部内において、収納部内から外側へ押し出される液体が流れる様子を示す説明図である。

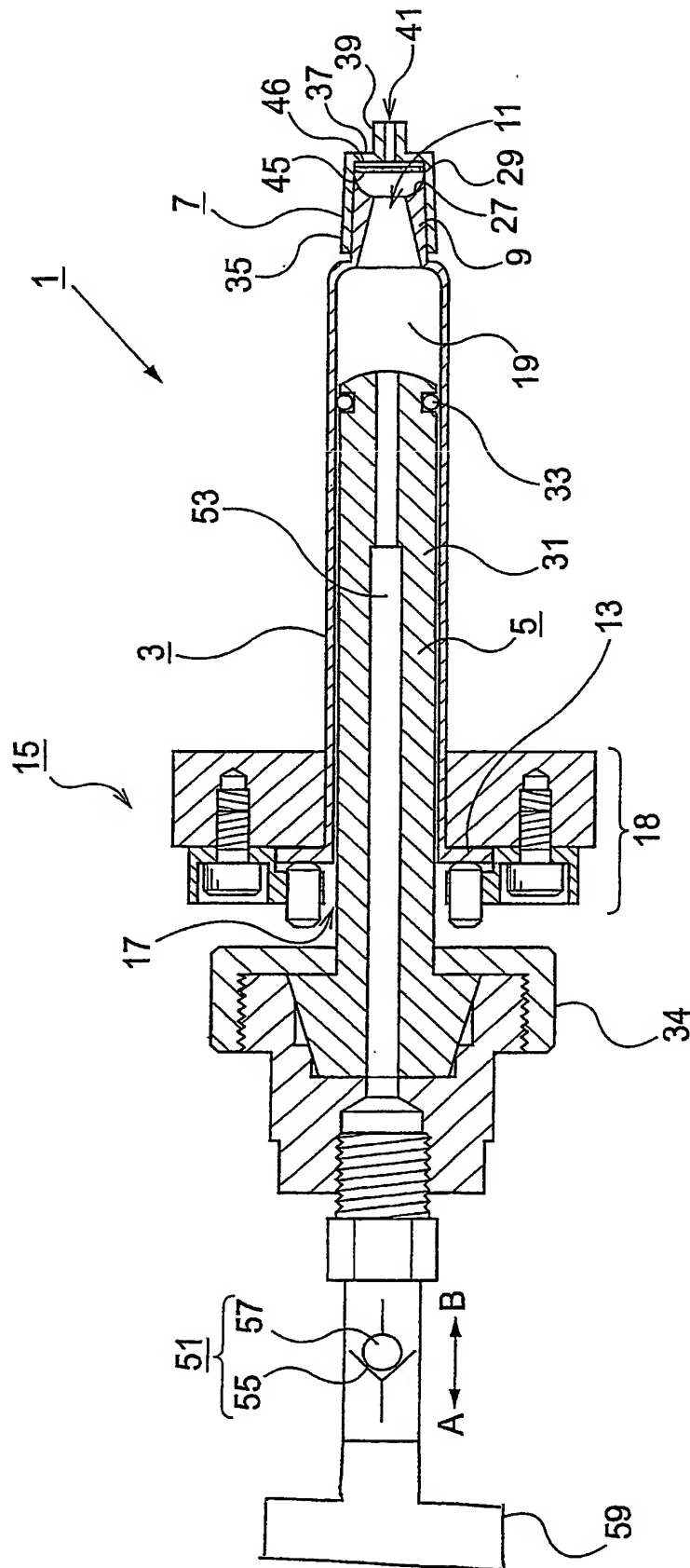
【図7】ピストン部材における逆止弁の他の実施の形態を示す説明図である。

【符号の説明】

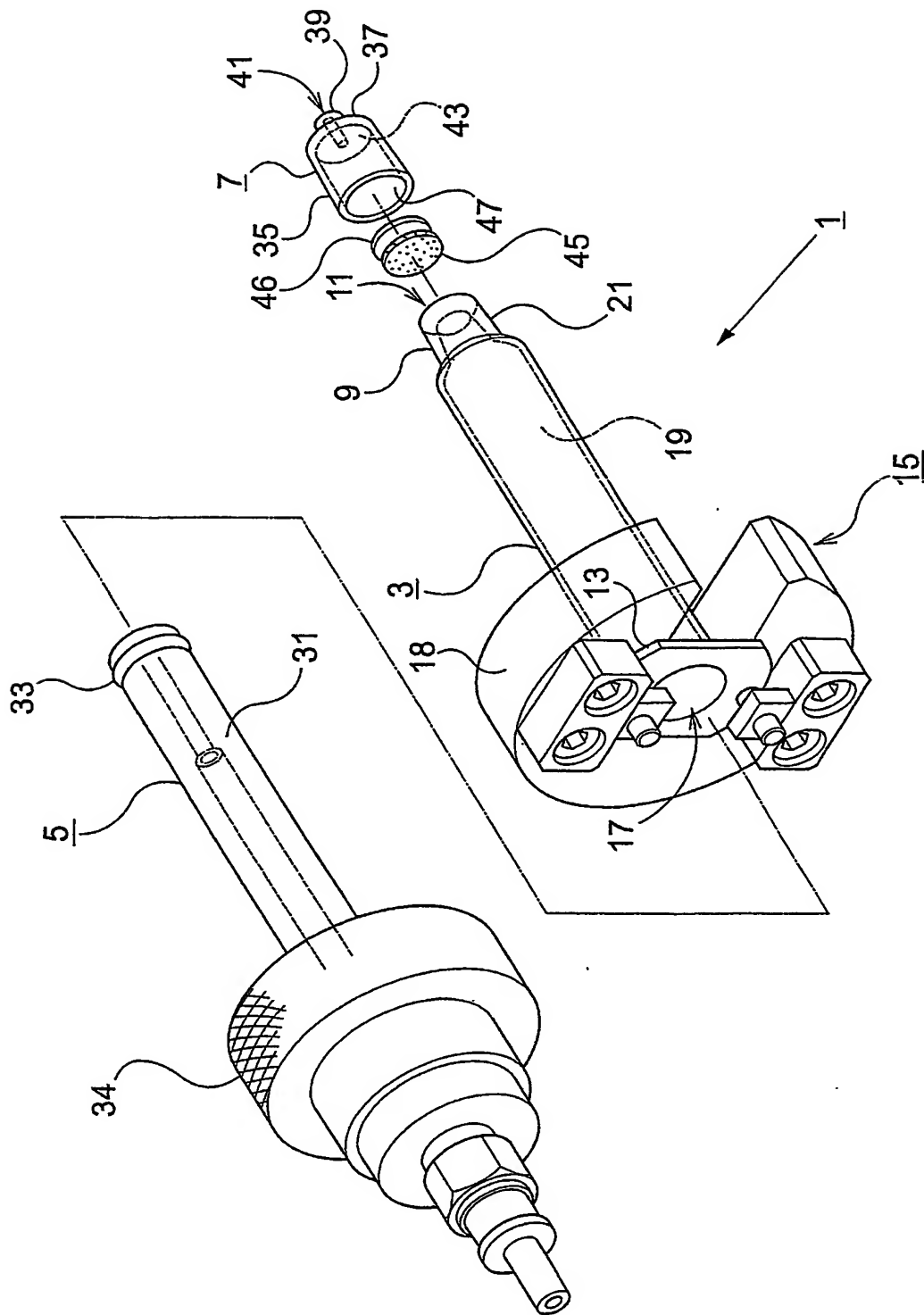
【0070】

- 1 核酸の分離精製装置
- 3 シリンジ
- 5 ピストン部材
- 7 固相保持部材
- 9 シリンジの先端部
- 11 第1開口部
- 13 フランジ部
- 15 シリンジの基端部
- 17 第2開口部
- 18 固定機構
- 19 収納部
- 21 テーパ
- 23 雄ねじ
- 25 雌ねじ
- 27 液体案内面
- 29 先端部の先端
- 31 プランジャ
- 33 Oーリング
- 34 操作部
- 35 本体部
- 37 端板
- 39 ノズル
- 41 流通孔
- 43 固相支持面
- 45 固相
- 46 ポリプロピレン焼結フィルター
- 47 テーパ
- 49 縮径部
- 51 逆止弁
- 53 連通路
- 55 弁座
- 57 弁体
- 59 圧力センサー

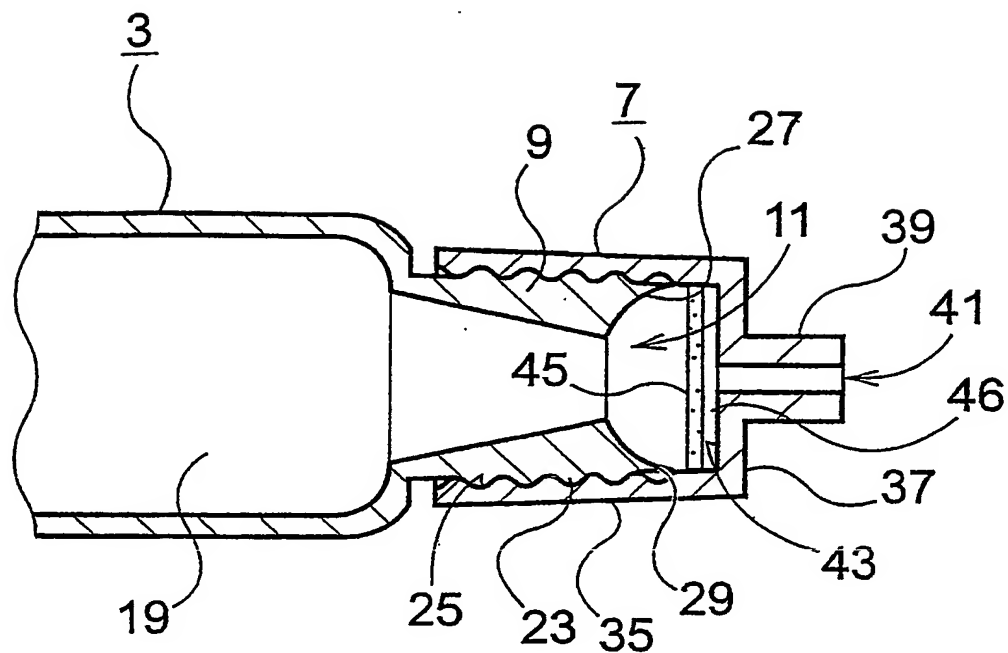
【書類名】 図面
【図 1】



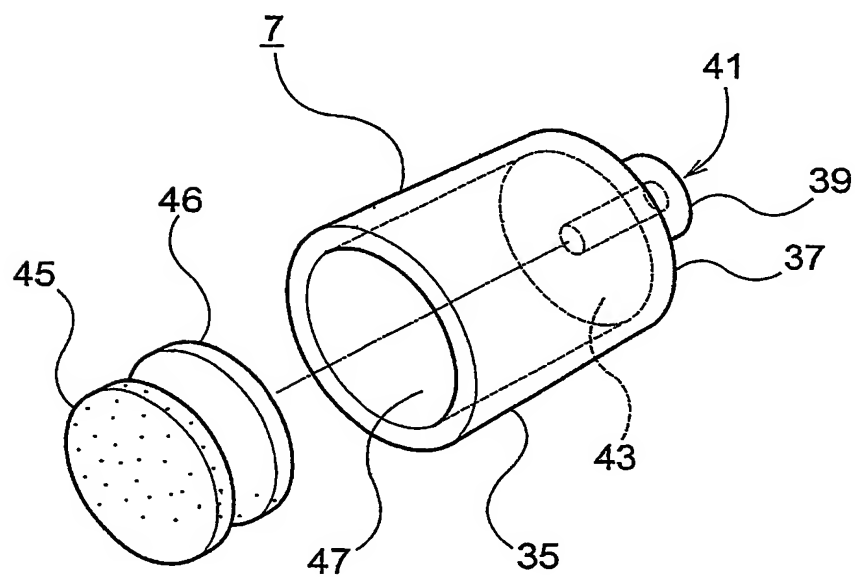
【図 2】



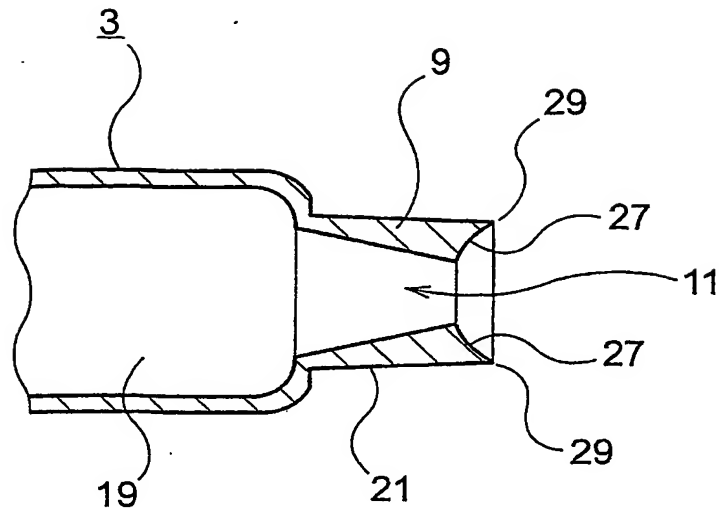
【図 3】



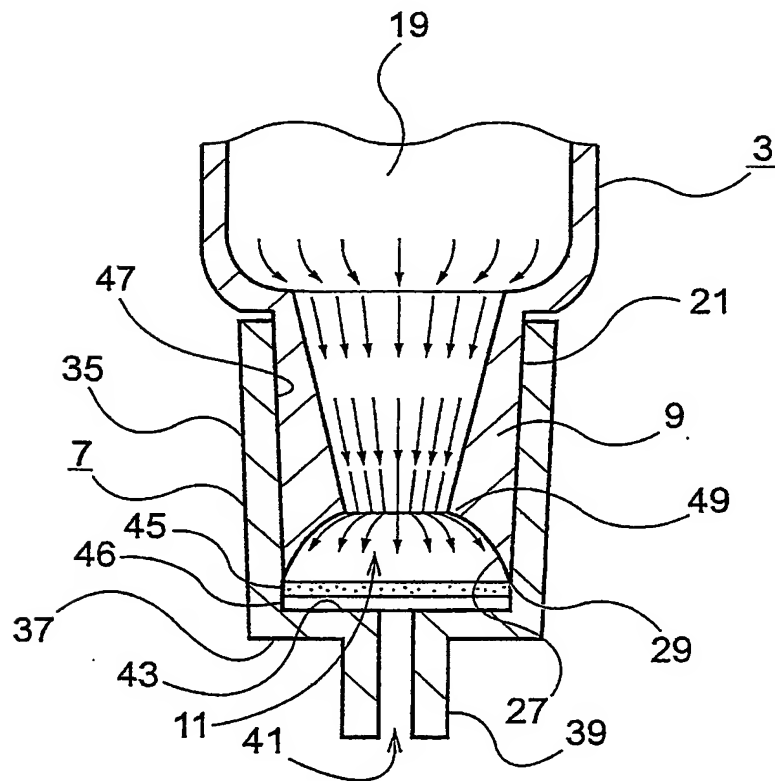
【図 4】



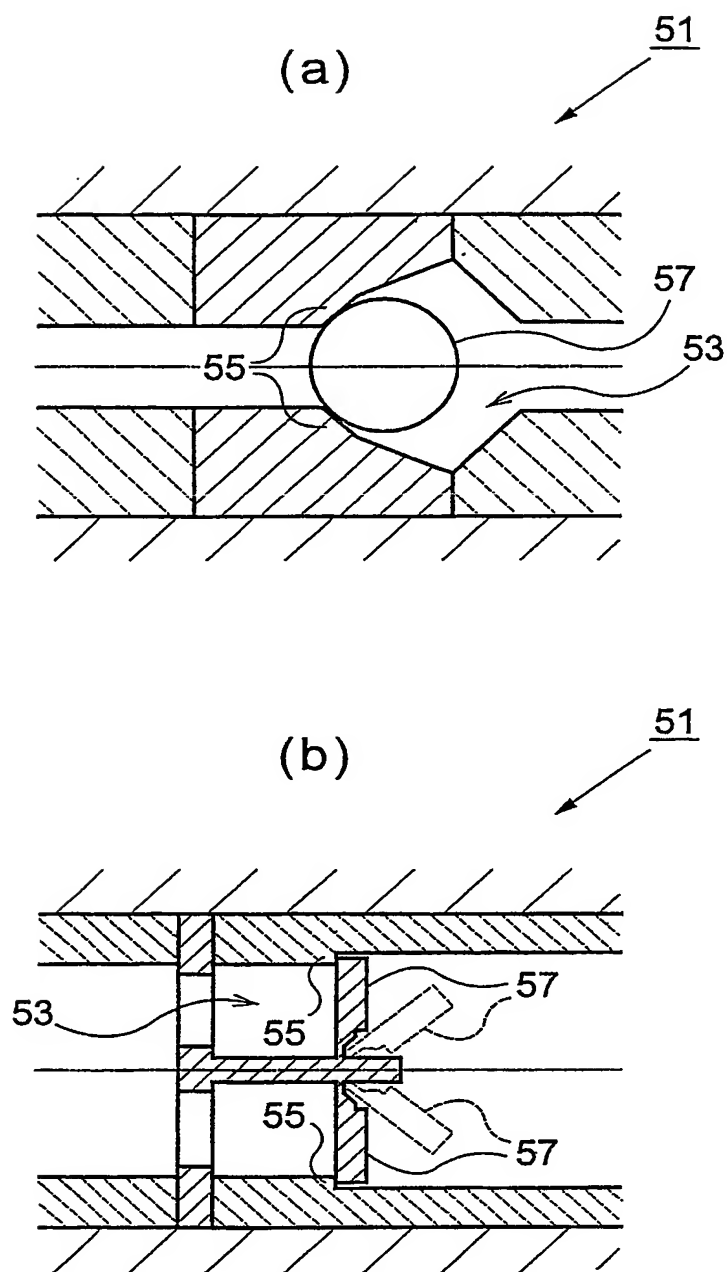
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 検体中の核酸を固相表面に吸着させた後、洗浄等を経て脱着させて核酸を分離精製する方法において、工程中に発生した泡をなくす方法を提供すること。

【解決手段】 固相に核酸を吸着させる溶液及び固相から核酸を脱着させる溶液をそれぞれ用いて固相に核酸を吸着及び脱着させる工程を含む、核酸の分離精製方法において、固相に核酸を吸着させる溶液が消泡剤を含むことを特徴とする核酸の分離精製方法。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 3 - 3 1 7 1 0 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 5 2 0 1]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 1 4 日

[変更理由]

新規登録

住 所

神奈川県南足柄市中沼 2 1 0 番地

氏 名

富士写真フイルム株式会社

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/013384

International filing date: 08 September 2004 (08.09.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-317104
Filing date: 09 September 2003 (09.09.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 04 February 2005 (04.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.